

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## VARIÉTÉ MÉLANOGENE DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR C. GESSARD.

(Travail de l'Institut Pasteur de Lille.)

On doit à M. le docteur Cassin la découverte d'un microbe que M. Radais<sup>1</sup> a identifié avec le bacille pyocyanique, en même temps qu'il lui reconnaissait la propriété, nouvelle pour cette espèce bactérienne, de donner naissance, dans certains milieux, à un pigment d'abord rouge, puis noir. C'est proprement une variété du bacille pyocyanique qu'on peut appeler *b. mélanogène* ou *de Cassin*. J'ai vu<sup>2</sup> que l'aptitude de ce microbe à produire le pigment rouge et noir était subordonnée à la présence de la tyrosine dans le milieu de culture. J'ai, par suite, assimilé ce pigment au pigment de même couleur que donne la tyrosine sous l'influence de sa diastase oxydante, la tyrosinase.

Rappelons dès le début, en tant que notion utilisable dans le cours de ce travail, que ce ferment, sous la forme de macération glycerinée de certains champignons, constitue un réactif biologique de la tyrosine comparable au réactif chimique, dit de Millon. Tous deux sont oxydants et produisent des colorations rouges dans la solution de tyrosine, puis des précipités avec décoloration de la liqueur, précipités en rapport avec la nature des éléments minéraux de chaque réactif, noir pour la diastase, rouge pour le réactif de Millon. Mais la tyrosinase a, peut-on dire, une spécificité plus étroite, car elle n'agit que sur la tyrosine actuelle, tandis que le réactif de Millon atteint la tyrosine dans la molécule d'albumine où elle est seulement en

1. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1897, p. 808.

2. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1898, p. 1033.

puissance, si l'on admet que cette tyrosine est la cause de la coloration qu'il donne avec les matières albuminoïdes.

J'étudierai dans ce mémoire les fonctions chromogènes du nouveau microbe. Cette étude, poursuivie dans les différents milieux, en parallèle avec les réactions du bacille pyocyanique anciennement connu et avec les réactions des réactifs diastasique et chimique dans ces milieux, doit contribuer à valider les titres de la variété nouvelle, à marquer la place qui lui peut être assignée à côté des autres réactifs de la tyrosine, enfin à vérifier l'assimilation que j'ai faite de l'action chromogène du microbe avec celle de la tyrosinase.

## I

### MILIEUX DE CULTURE

*Milieux salins.* — Faisons d'abord la preuve que la présence de la tyrosine est la condition nécessaire de la production du nouveau pigment. Pour cela prenons un milieu de composition connue : ce sera le mélange salin qui m'a déjà servi pour l'étude des fonctions chromogènes des microbes, où le taux du succinate d'ammoniaque sera seulement réduit de 10 à 1 gramme, pour les raisons qu'on trouvera plus loin :

Succinate d'ammoniaque.....	1 gr.
Phosphate bibasique de soude ou de potasse.....	5 »
Sulfate de magnésie.....	2,50
Chlorure de calcium cristallisé.....	1,25
Eau distillée.....	1,000 c. c.

La série des expériences dans ce milieu, en vue de la démonstration que nous cherchons, va faire apparaître, comme en un résumé, les influences respectives et réciproques du microbe et du milieu, telles qu'elles entrent en jeu dans tout phénomène microbien.

Par exemple, pour la composition ci-dessus, le bacille pyocyanique ordinaire donne bien ses deux pigments, le bleu de la pyocyanine et le vert fluorescent, auxquels succède la couleur habituelle du vieillissement, la teinte feuille morte. Le nouveau germe ne se comporte pas autrement. Sa fonction spéciale n'a pas d'application en l'absence de l'élément approprié.



Mais ajoutons à notre mélange 0,5 pour 1,000 de tyrosine. Ce même germe va y donner naissance à une belle coloration rose qui passe au rouge acajou, reproduisant ainsi la succession de couleurs que donne la tyrosinase dans une solution de tyrosine. Avec le bacille ordinaire, au contraire, il n'y a pas de changement : la culture a le même aspect que dans le mélange dépourvu de tyrosine. Cet élément est comme s'il n'existait pas, en dehors de l'aptitude spéciale du microbe à le mettre en œuvre.

La production du pigment rouge, qui résulte de la coexistence de la tyrosine et du microbe spécialement doué, dépend encore d'un certain rapport entre les éléments constitutants du milieu. Elle est compromise si ce rapport est troublé. Par exemple, si nous portons à 2 grammes la proportion de succinate d'ammoniaque, *a fortiori* si nous la relevons au chiffre ancien de 10 grammes par litre, nous voyons que le microbe ne donne plus le pigment rouge de la tyrosine : l'aspect est celui d'une culture en milieu dépourvu de tyrosine, et montre simplement les pigments ordinaires du bacille pyocyanique. Toutefois le vieillissement imprime, aux cultures faites dans ces dernières conditions de milieu, des modifications sur lesquelles nous aurons à revenir.

Enfin, avec les conditions requises de composition élémentaire du milieu et d'aptitude fonctionnelle du microbe, il faut encore tenir compte du degré d'énergie du germe, on dirait de sa virulence, avec une autre unité de mesure qu'une apparition de pigments. Tel germe révèle sa spécificité et produit le pigment rouge dans le mélange à 0,5 de tyrosine et 1 gramme de succinate d'ammoniaque pour 1,000, ainsi que nous l'avons vu. Tel autre, toutes choses égales d'ailleurs, ne peut faire prédominer le rouge que si la proportion de succinate d'ammoniaque est abaissée à 0,75. Un troisième, dégénéré entre mes mains, comme c'est fréquemment le cas dans les vicissitudes du laboratoire, ne supporte que 0,25 de succinate d'ammoniaque. Au delà de ces limites respectives, ces différents germes ne produisent que les pigments pyocyaniques ordinaires. Il y a donc, pour influencer la production du nouveau pigment et des pigments pyocyaniques ordinaires, comme un balancement entre la tyrosine et le succinate d'ammoniaque, et la détermination en faveur de l'un ou de

l'autre pigment réside dans un rapport de proportions entre les deux éléments, variable avec la vigueur du germe. J'ai montré autrefois qu'il en était de même pour l'élément azoté et l'élément phosphaté, au regard des fonctions pyocyanogène et fluorescigène du bacille pyocyanique ordinaire.

Dans les conditions de milieu les plus favorables à la production du pigment rouge, les pigments pyocyaniques ordinaires peuvent encore apparaître, d'une manière éphémère, à vrai dire, tout au début de la culture. On les exclut à coup sûr en supprimant le succinate d'ammoniaque. Le microbe peut se cultiver en série dans le milieu salin, réduit ainsi à la tyrosine comme aliment azoté et hydrocarboné. La coloration rose ne se fonce pas beaucoup dans ce cas. Enfin, dans une simple solution de tyrosine à 0,5 0/00, on peut encore entretenir des cultures en série, assez pauvres, à la vérité : le liquide rosit lentement, reste limpide et d'un rose faible. C'est la reproduction expérimentale des cas, qui ne sont pas rares, où la solution de tyrosine se colore spontanément, par ensemencement accidentel de quelque germe propre à cet effet, comme il en existe certainement en dehors de notre bacille.

Dans le milieu salin, qui contient seulement de la tyrosine ou, avec la tyrosine, du succinate d'ammoniaque sous la dose où le pigment rouge apparaît seul, la couleur des cultures se maintient au rouge acajou. D'autre part, dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine, ce même rouge acajou est, comme on sait <sup>1</sup>, la seule couleur imputable au ferment lui-même, et la seule qu'on obtienne quand on emploie la solution glycinée de tyrosinase sous la moindre dose. La couleur noire et le précipité noir, qui succèdent au rouge dans les expériences avec la tyrosinase, sont dus, rappelons-le, aux sels, que fournit en quantité suffisante la solution diastasique, quand elle est employée à forte dose, ou qu'on ajoute, pour les doses faibles, dans la solution de tyrosine. Cette adjonction de sels est bien réalisée dans notre milieu salin : aussi, même avec la plus faible dose de solution diastasique, on y voit succéder au rouge la couleur noire, puis le précipité noir avec décoloration de la liqueur.

Quand la couleur rouge, dans ce même milieu, est due au

1. Ce Volume, p. 594.



microbe, on n'observe plus pareils changements, ni spontanément, ni même par addition après coup d'un excès d'un sel alcalino-terreux, secondée même de l'action de la chaleur, toutes conditions propres, comme nous savons, à favoriser le passage au noir<sup>1</sup>. En sorte que l'aspect des cultures dans ce milieu salin justifie mal le nom de mélanogène que je propose pour la nouvelle variété de bacille. Comment expliquer cette divergence, si l'ensemble de nos expériences nous permet d'identifier complètement par ailleurs les pigments d'origines diastasique et microbienne? Il faut vraisemblablement l'attribuer à quelque-une de ces actions empêchantes<sup>2</sup>, comme celles qu'exercent les matières organiques sur un si grand nombre de réactions chimiques, et qui pourrait dépendre ici de quelque produit de la vie microbienne.

Revenons maintenant au milieu salin qui contient tyrosine et succinate d'ammoniaque, et où le microbe n'a produit que les pigments bleu et vert, comme un bacille pyocyanique ordinaire. Cette ressemblance ne s'étend pas à toute la durée de la culture, car, en vieillissant, la culture prend une teinte rougeâtre et aboutit, en dernière analyse, non plus à la teinte feuille morte accoutumée dont le ton dominant est l'orangé, mais à une teinte brun foncé, qu'on ne peut mieux comparer qu'à la couleur de l'infusion de café, et que n'atteint jamais le milieu salin qui ne contient que de la tyrosine sans succinate d'ammoniaque. Le rouge acajou, dans ce dernier cas, le brun café dans les autres cas où le rouge manque ou n'est qu'éphémère, dénoncent donc la tyrosine dans les milieux salins, de façon plus ou moins rapide, mais également sûre.

1. J'ai retenu cette différence d'effet de l'alcalino-terreux pour distinguer le pigment rouge d'origine diastasique du pigment rouge d'origine microbienne (ce Vol. p. 603.) L'ébullition simple peut servir aussi, mais pour le rose du début seulement : le rose dû à la diastase se décolore ; le rose dû au microbe résiste à cette épreuve. Mais, même avec la diastase, cette décoloration par la chaleur n'est plus complète, quand le pigment s'est foncé et oxydé à l'air.

2. *Action empêchante de l'albumine de l'œuf de poule.* — Si l'on fait des dilutions albumineuses de tyrosinase au  $\frac{1}{2}$ , au  $\frac{1}{3}$ , au  $\frac{1}{4}$ , etc. (en mêlant 1 goutte de solution glycinée de diastase avec 1, 2, 3 gouttes, etc., d'albumine d'œuf), qu'on introduise 1 goutte de chaque dilution dans 2 c. c. de solution de tyrosine, et qu'après formation du pigment on ajoute un excès de chlorure de calcium, on obtient le précipité avec décoloration de la liqueur pour  $\frac{1}{2}$ , des précipités partiels qui laissent la liqueur colorée pour  $\frac{1}{3}$  et  $\frac{1}{4}$ . Pour les dilutions plus étendues, la précipitation ne se fait plus, au lieu qu'elle est toujours possible, quand on s'est servi d'eau pour les mêmes dilutions.

La tyrosine fait partie de beaucoup de produits naturels. Voyons comment le microbe sait la reconnaître dans les milieux de culture que fournissent ces produits.

*Pomme de terre.* — La tyrosine révèle déjà sa présence dans la pomme de terre par le noircissement du suc sous l'influence du ferment oxydant qui s'y trouve également contenu. Il va de soi que ce ferment est détruit par la cuisson et qu'il ne s'agit que de l'action du microbe dans les effets que nous pourrions constater. Le milieu est, comme on sait, très favorable aux fonctions chromogènes des microbes en général, à celles du bacille pyocyanique en particulier, que la pomme de terre soit sèche ou qu'elle baigne en partie dans du bouillon peptoné glycériné, selon la formule qui sert à la culture du bacille tuberculeux. Dans ce dernier cas, le bacille pyocyanique offre le plus souvent un beau vert bleu velouté, à la partie supérieure de la pomme de terre, où l'air afflue, harmonieusement fondu par dégradation insensible avec le jaune de la pyocyanine réduite des parties inférieures moins aérées. C'est aussi l'aspect que présente d'abord la culture du bacille mélanogène. Puis, peu à peu, le noir se substitue à ces brillantes couleurs, envahit à leur suite toute la pomme de terre, et lui donne l'apparence d'un bloc de cirage, suivant l'expression imagée de M. Radais. Sur la pomme de terre sèche, c'est d'emblée une teinte rouge marron d'aspect luisant, qui rappelle une culture de morve. Elle passe plus ou moins rapidement au noir brillant.

*Œuf.* — Étudions séparément le jaune et le blanc.

La tyrosinase révèle dans le jaune la présence de la tyrosine sous l'état où elle peut la déceler, c'est-à-dire dégagée de la molécule albuminoïde. En effet, si l'on mélange la solution glycérinée diastasique avec le jaune d'œuf, on voit la partie superficielle se colorer en noir après quelques heures. La viscosité limite l'accès de l'air, partant l'extension de la coloration en profondeur. Mais il suffit de ramener les parties inférieures à la surface, pour les voir noircir à leur tour au contact de l'air. J'ai mis un soin particulier à vérifier cette présence de la tyrosine dans le jaune d'œuf, parce que, à ma connaissance, elle n'y a pas été signalée jusqu'ici. J'ai obtenu sa réaction diastasique dans le jaune d'un œuf tout récemment pondue. D'autre part, j'ai fait trois décoctions successives, de même durée, du même



jaune dans la même quantité d'eau : la quantité de tyrosine s'est trouvée fort réduite dès le second produit de décoction. La tyrosine préexiste donc bien dans le jaune d'œuf frais.

Le bacille pyocyanique ordinaire donne, dans le jaune d'œuf, cette couleur rouge brun qu'a signalée autrefois M. Rohrer <sup>1</sup>.

La variété mélanogène y produit rapidement une couleur noire. Il faut seulement avoir soin d'ajouter de petites quantités d'eau distillée stérilisée, au début ou au cours de la culture, pour obvier à l'épaississement du milieu à la chaleur de l'étuve, en même temps qu'on renouvelle par agitation les surfaces exposées à l'air pour que toute la masse se colore.

Le blanc d'œuf, au contraire, ne se colore pas par la tyrosinase. J'ai prolongé l'observation, en me rappelant le long retard que j'avais vu apporter par l'albumine à la réaction de la tyrosinase sur la tyrosine. Je ne suis pas assuré encore que de la tyrosine n'y existe pas, qui se déroberait à ce moyen de recherche, à la faveur du grand excès de matière empêchante <sup>2</sup>.

M. Gayon, dans ses *Recherches sur les altérations spontanées des œufs* <sup>3</sup>, admet, avec les auteurs, qu'il existe des traces de tyrosine dans le blanc d'œuf. Il décrit, en même temps, une curieuse transformation de l'albumine de l'œuf, où, « sans développement corrélatif d'organismes », apparaît une notable quantité de tyrosine, dispersée dans la masse en amas de cristaux aiguillés. Ma méthode, mise en œuvre sur des œufs frais, ne m'a jamais rien montré de pareil. Il est tout au moins digne de remarque que le microbe non plus n'y révèle pas la présence de la tyrosine dans le blanc d'œuf. Le bacille mélanogène ne se comporte pas autrement que le bacille ordinaire, et ne donne naissance, dans le blanc d'œuf, qu'au pigment vert fluorescent, lequel aboutit à la teinte feuille morte. Toutefois on voit aussi, dans certains cas, survenir, après un temps prolongé, la teinte brun café que nous avons vue déjà, caractéristique de la tyrosine en milieu salin âgé. Contentons-nous, pour l'instant, d'enregistrer cette particularité; elle se rattache à une série de faits que nous étudierons ensemble.

La cuisson rend le milieu bien différent, aussi bien pour le

1. *Centralblatt f. Bakteriologie*, 1892, p. 333.

2. 0,005 de tyrosine, introduits sous le moindre volume d'eau dans 100 c. c. d'albumine, ont pourtant été bien révélés par le réactif diastasique.

3. *Thèse de la Faculté des Sciences*, Paris, 1875.

bacille mélanogène que pour le bacille ordinaire. Le blanc d'œuf coagulé est mieux approprié à la fonction pyocyanogène de ce dernier. De la pyocyanine y apparaît aussi avec le mélanogène ; du brun et du noir y succèdent, et finalement toute la masse blanche est convertie en beau noir. Cependant la tyrosinase n'indique encore que peu de tyrosine dans ce blanc coagulé, et, par contact prolongé, lui communique seulement une légère teinte chamois. Nous retrouverons, à propos des autres matières albuminoïdes, ce contraste entre les données de la diastase et les effets de l'action microbienne, et nous aurons à en chercher l'explication.

Quoi qu'il en soit, il résulte de cette propriété du microbe qu'un œuf dur, ensemencé à travers la coquille et dans le jaune avec un germe mélanogène, se transforme tout entier, au bout d'un certain temps, en une masse noire d'aspect de putrilage. Cette transformation s'accompagne d'une odeur valérianique prononcée, qui caractérise fréquemment les cultures mélanogènes dans les milieux albuminoïdes.

*Lait.* — Le lait fournit un bon aliment aux fonctions chromogènes du bacille pyocyanique, généralement après que celui-ci l'a transformé par la présure et la caséase qu'il sécrète. Mais cet ordre de succession des phénomènes n'a rien d'absolu, et la température, l'aération, la forme du vase d'où dépend l'accès de l'air, favorisent plus ou moins l'un ou l'autre phénomène, ou les font coexister. Le bacille mélanogène fait du lait un liquide noir d'encre, après qu'il y a déterminé les transformations et les colorations habituelles. Cependant la tyrosinase ne communique au lait qu'une légère teinte rose, laquelle n'implique que peu de tyrosine. Nous retrouvons ici le contraste entre les réactions diastasique et microbienne, que le blanc d'œuf nous a déjà montrées, et dont le milieu suivant va nous offrir encore un plus frappant exemple.

*Peptones.* — Les peptones sont les produits de transformation des albuminoïdes par l'une des diastases protéolytiques, pepsine ou trypsine, qui en font de la peptone pepsique ou pancréatique. Le réactif de Millon ne distingue pas entre les deux produits : il les colore en rose tous deux, comme les albuminoïdes dont ils sont dérivés. Il n'en est pas de même de la tyrosinase, que M. Harlay <sup>1</sup>

1. Thèse de doctorat de l'École supérieure de Pharmacie de Paris, 1900.



a pu proposer pour reconnaître la nature d'une peptone. En l'appliquant comme réactif à cette recherche, il a confirmé et mis à profit le fait que l'action de la pepsine ne sépare pas la tyrosine engagée dans la molécule albuminoïde, tandis que la trypsine, réalisant une dislocation plus complète de cette molécule, libère la tyrosine et la met, par conséquent, dans la peptone pancréatique, sous l'état où la tyrosinase peut agir sur elle. Aussi la tyrosinase donne-t-elle les colorations rouge et noire dans la peptone pancréatique, au lieu que, dans la peptone pepsique, c'est une couleur rouge qui passe au vert olive, au bout de quelques heures.

Comment le microbe va-t-il se comporter dans l'un et l'autre milieu? Comme nous l'avons constaté plusieurs fois déjà, au début les cultures des deux bacilles pyocyaniques ne diffèrent pas. Mais, en vieillissant, les cultures du bacille ordinaire prennent les teintes habituelles, feuille morte ou rougeâtre, suivant qu'y a prédominé le pigment vert ou le bleu. Dans les cultures mélanogènes des deux peptones, une teinte brune apparaît bientôt sous ces pigments vert ou bleu en débutant par la surface, s'y substitue en gagnant en profondeur, se fonce toujours plus, et finalement tout le liquide est brun noir. Ainsi, le microbe, comme le réactif de Millon, confond les deux peptones dans une réaction commune et, à l'inverse de la tyrosinase, ne tient pas compte de l'état sous lequel la tyrosine y préexiste. Mais, avant d'approfondir ce phénomène, achevons l'étude des milieux par la gélatine et le bouillon, sur lesquels nous pourrions moins nous appesantir.

*Gélatine.* — J'ai vu autrefois que, sans addition d'autre aliment, la gélatine<sup>1</sup> peut servir au développement du bacille, sinon à l'élaboration des pigments pyocyaniques. Elle ne contient de tyrosine sous aucun état, comme le montre l'absence de coloration par le réactif de Millon. Le microbe n'y donne pas non plus du pigment correspondant. On ne peut y étudier que le pouvoir liquéfiant : l'étude comparative des deux bacilles pyocyaniques attribue la supériorité au microbe de Cassin.

*Bouillon.* — J'insisterai, comme j'ai fait déjà, sur l'avantage qu'il y a, pour l'analyse des fonctions microbiennes, à ne com-

1. Solution de gélatine à 100 0/00, clarifiée avec un blanc d'œuf, soit 30 grammes, qui peut bien apporter quelque élément nutritif dans le mélange.

prendre et à n'employer sous ce nom que le simple produit de la décoction de la viande<sup>1</sup>, sans aucune autre addition. Notre nouvelle variété de bacille va témoigner encore, par la distinction qu'elle fait entre le bouillon et la peptone, de l'intérêt qu'il y a à ne pas mélanger l'un et l'autre, comme font beaucoup de formules de milieux de cultures.

Il n'y a que des traces de tyrosine dans le bouillon de veau, comme l'indique un faible rose par le réactif de Millon, à peine une teinte ambrée par la tyrosinase. Le bacille mélanogène ne décèle pas ces faibles traces : sa culture en bouillon n'est différente, à aucun moment, de celle du bacille pyocyanique ordinaire. Sa ressemblance avec ce dernier se complète par la possibilité de constituer, au regard du bouillon, des races qui y produisent une de la fluorescence verte seulement, une autre seulement de la pyocyanine, une troisième enfin qui n'y produit pas de pigment; toutes races qui, reportées en peptone, y manifestent uniformément la fonction pyocyanogène, caractéristique de l'espèce, puis la fonction mélanogène, caractéristique de la variété. J'ai cherché, par la méthode des cultures en plaque, des représentants de ces différentes races dans les cultures du mélanogène type, c'est-à-dire, qui produit à la fois les pigments vert et bleu dans le bouillon. Ces cultures, en effet, ne sont pas plus homogènes, c'est-à-dire composées de cellules toutes douées d'aptitudes égales, que ne le sont les cultures microbiennes en général : elles m'ont fourni, juxtaposés au type complet, les différents types de dégradation qui correspondent à la perte d'une ou des deux fonctions pigmentaires.

## II

### DISCUSSION DES RÉSULTATS

De l'ensemble des faits qui précèdent on conclura :

La tyrosine est nécessaire à la production du nouveau pigment du bacille pyocyanique.

Ce pigment est identique à celui que donne la tyrosine sous l'influence de la tyrosinase des champignons.

1. Décoction d'une demi-heure, de viande de veau, pour obtenir 2 parties de bouillon, qu'on neutralise simplement.



Il y a, dès lors, de grandes présomptions pour que l'agent de cette transformation de la tyrosine par le microbe soit cette même tyrosinase.

On admet volontiers aujourd'hui que mainte action microbienne s'exerce par l'intermédiaire d'une diastase sécrétée par le microbe. Il s'en faut pourtant que, dans tous les cas où cette conclusion est admise, on ait relevé des analogies aussi étroites que dans le cas qui nous occupe, entre l'action du microbe et l'action d'une diastase bien connue d'autre part. Identité de la substance passive, identité de la transformation qu'elle subit; la conclusion logique semble bien : identité de l'agent de cette transformation.

Certes la preuve sans réplique manque : je n'ai pu déceler la tyrosinase ni dans les cultures ni dans l'eau de lavage des corps microbiens. Il faudrait peut-être déchirer les cellules comme Buchner l'a fait pour trouver sa zymase, mais un bacille se prête moins à cette opération qu'un globule de levure, et je n'ai pas poussé plus loin cette recherche.

Considérons encore, en faveur de l'existence de la tyrosinase microbienne, combien la tyrosinase est répandue dans la nature, partie intégrante de tant de végétaux divers : betterave, dahlia, pomme de terre, nombreuses espèces de champignons, etc. Nous accepterons alors sans peine que, semblable en cela à plusieurs autres diastases, elle puisse tout à la fois être un produit d'êtres d'organisation complexe, et figurer dans les sécrétions des êtres les moins différenciés morphologiquement, les organismes monocellulaires. De ce point de vue on serait plutôt fondé, pour le dire en passant, à s'étonner que la tyrosinase ne se rencontrât pas aussi, quelque jour, dans l'économie animale, où elle n'a pas été signalée jusqu'ici.

\*  
\* \*

Tenons donc pour démontré que la tyrosinase existe dans le microbe et qu'elle lui sert à élaborer le pigment rouge aux dépens de la tyrosine. Il reste à comprendre que, dans certains milieux où la tyrosinase des champignons ne nous a révélé que de faibles quantités de tyrosine, le microbe, avec sa diastase identique, ait produit une quantité de pigment qui correspond à une quantité de tyrosine bien plus grande. Tel est le phéno-

mène contradictoire que nous ont offert, on s'en souvient, les expériences sur les milieux albuminoïdes : blanc d'œuf, lait, peptone pepsique. Rappelons que, pour cette dernière, nous avons dû conclure même à l'absence totale de tyrosine libre, d'après l'essai préliminaire avec le réactif des champignons, et que la culture n'y a pas moins donné lieu à l'apparition du pigment spécial. Nous ne nous résoudrons pourtant pas encore à abandonner la conclusion, qui découle par ailleurs d'expériences si décisives, que la tyrosine est indispensable à la production de ce pigment. Car la réaction positive avec le réactif de Millon subsiste, pour nous assurer que toute trace de tyrosine n'est pas absente de ces milieux. Mais encore une fois, c'est dans l'état où elle est méconnaissable pour la tyrosinase. Nous sommes donc amené à conclure que le microbe, pour faire son pigment identique à celui que donne la tyrosinase des champignons avec la tyrosine en nature, possède le pouvoir de réaliser préalablement cette dernière, à l'aide de ses éléments engagés dans la molécule albuminoïde. Les agents chimiques (alcalis, acides), capables d'une pareille transformation, nous enseignent qu'elle résulte simplement d'une fixation d'eau. L'équivalent biologique des agents chimiques doit être cherché où l'on sait le trouver d'ordinaire, c'est-à-dire parmi les diastases. Entre les diastases hydratantes connues, la trypsine fait subir cette même transformation à la molécule albuminoïde, au point d'accumuler, comme nous avons vu, la tyrosine dans le produit de la digestion pancréatique. Nous devons donc admettre l'existence de la trypsine dans le bacille pyocyanique de la nouvelle variété. Aussi bien, d'autres microbes ont déjà présenté ce ferment. Pouvons-nous constater dans les cultures, sinon le ferment lui-même, du moins son produit, la tyrosine, et cela, d'une façon plus immédiate que par le pigment qui en dérive sous l'action du microbe? Le lait seul permet cette recherche à l'aide de notre réactif habituel, car le lait, comme nous l'avons vu, ne se colore que faiblement par la diastase des champignons. Un essai comparatif du lait normal et du lait où le microbe cultive depuis quelque temps, mais n'a pas encore manifesté sa fonction mélanogène, m'a bien donné, en effet, une coloration plus foncée dans le produit de culture. Mais j'ai lieu de croire que la trypsine ne diffuse pas dans le liquide de culture, et que la pro-



duction, comme la transformation de la tyrosine, reste un phénomène intracellulaire.

\*  
\* \*

Je dois maintenant prévenir la confusion de deux phénomènes distincts, qui pourrait résulter de la synonymie dans la désignation des couleurs qu'ils font apparaître, synonymie due elle-même à la pauvreté du vocabulaire dont nous disposons pour désigner les nuances. Ainsi, j'ai décrit autrefois une teinte rouge brun dans les vieilles cultures de bacille pyocyanique en peptone et en gélatine glucosée, et je l'ai attribuée au vieillissement d'un troisième pigment différent du vert florescent et de la pyocyanine. J'ai reproduit ce phénomène en parallèle avec le phénomène nouveau. La preuve que le rouge brun qui s'y montre n'a rien de commun avec la coloration analogue de la nouvelle variété pyocyanique, c'est qu'il est produit par le bacille pyocyanique ordinaire, incapable de transformer ainsi la tyrosine, et que, d'autre part, son milieu de prédilection est la gélatine où, faute de tyrosine, le bacille mélanogène lui-même ne produit pas son pigment spécial.

\*  
\* \*

Ainsi la distinction est bien établie entre les deux bacilles pyocyaniques, l'ancien et le nouveau. Si l'on admet que le microbe doué de la plus grande complexité fonctionnelle doit être pris pour le type normal de l'espèce, le nouveau bacille peut à bon droit revendiquer ce titre sur l'ancien. Celui-ci, sous ce point de vue, représenterait un descendant dégénéré du premier. Dans cette interprétation, remarquons à quel point il aurait perdu toute trace de cette fonction mélanogène, qui caractérise le type dont il serait descendu.

Mais on peut aussi penser qu'un germe du type pyocyanique le plus anciennement connu s'est trouvé dans des conditions particulièrement favorables à l'acquisition de la fonction nouvelle. Telles seraient les circonstances pathologiques<sup>1</sup> où le nouveau bacille s'est rencontré et où a pu s'exercer la faculté bien connue de l'organisme vivant de créer ou d'exalter les apti-

1. RADAIS, *loco citato*; CHARRIN, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1897, p. 810.

titudes microbiennes. Cette vue se concilie mieux surtout avec la rareté du nouveau germe <sup>1)</sup>, comparée à la fréquence et à l'ubiquité de l'ancien.

### III

#### CONCLUSIONS

Résumons les faits contenus dans ce travail. Un germe pyocyanique nous a montré une fonction chromogène nouvelle. Nous avons vu que le nouveau pigment dépendait de la présence de la tyrosine dans les milieux de culture. Son identité avec le pigment que donne la tyrosine sous l'influence de la tyrosinase nous a fait admettre l'existence de cette tyrosinase dans le microbe. Le microbe emploie une autre diastase, la trypsine, pour amener la tyrosine des matières albuminoïdes sous l'état où sa tyrosinase peut agir sur elle. Ainsi, le microbe atteint la tyrosine aussi bien combinée que libre, et par là est comparable au réactif de Millon. Peut-être même l'analogie se poursuit-elle dans le détail et peut-on concevoir, dans l'action du réactif de Millon lui-même, deux phases, l'une hydratante, qui dégage la tyrosine des matières albuminoïdes, l'autre oxydante, qui la rougit ; ce ne serait pas en contradiction, au moins, avec ce qu'on sait de la décomposition des matières albuminoïdes en milieu acide comme celui qu'offre le réactif azoto-mercurique, non plus qu'avec les conditions de temps et de température qu'on sait nécessaires pour que la coloration apparaisse avec ce réactif.

Nous pouvons dire encore : étant donnée une fonction d'un être vivant, dont on ne connaissait, avec son origine cellulaire et son aboutissant, que les produits complexes qui l'alimentent, l'étude expérimentale a révélé, dans ces produits, le principe chimique unique auquel la fonction s'adapte ; dans

1. Rareté qui peut être due aussi à ce que l'attention n'avait pas été appelée sur cette variété et qu'on n'était pas préparé à la reconnaître. M. Radais fut un long temps avant d'y constater le caractère spécifique, la production de pyocyanine. Cependant M. G. Thiry dit récemment avoir observé un germe de cette variété provenant d'une eau. (*Bacille polychrome et Actinomyces mordoré*, Paris, 1900, p. 76.)



l'être vivant, l'agent chimique par lequel elle s'exerce. Dans l'état actuel de la science, nous devons en demander autant pour les diverses fonctions. Peut-on entrevoir que les autres fonctions chromogènes du bacille pyocyanique seront ramenées à des termes aussi simples et, en particulier, rattachées à des actions diastasiques? Certains faits, sur lesquels ce n'est pas le lieu d'insister, me donnent à penser que de telles actions pourraient bien aussi entrer en jeu dans la production de ses autres pigments. En tout cas, la possibilité de l'association et de la coopération de diverses diastases, comme cette étude nous en a fourni un exemple, jointe à la notion récente<sup>1</sup> que des diastases peuvent faire aussi œuvre de synthèse, aide à concevoir que des actions diastasiques pourraient intervenir dans l'élaboration de produits aussi différenciés, même à partir des éléments chimiques les plus simples, comme ceux du milieu salin où nous voyons le bacille pyocyanique élaborer ses pigments habituels.

1. HILL, 1898.

---

# RECHERCHES SUR L'ANTISPERMOTOXINE

PAR W. WEICHARDT

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Lès théories de MM. Bordet et Ehrlich-Morgenroth sur la nature et les lieux de production des différents poisons cellulaires ont inauguré une ère de recherches très fécondes en promesses pour l'avenir.

A la nouvelle orientation résultant de ces importantes recherches, nous devons, entre autres, la découverte du *diagnostic* médico-légal du *sang humain* et, dans la *sérothérapie*, un grand nombre de voies nouvelles.

Dans son important travail sur les *cytotoxines*<sup>1</sup>, M. le professeur Metchnikoff conclut ainsi :

« MM. Roux, Borrel, Lesné et Widal ont démontré dans leurs travaux, exécutés avec une si parfaite technique, que le sang des urémiques et des éclamptiques n'est point, d'une manière spécifique, toxique pour les animaux, même si on le met en rapport avec les éléments nerveux. Il est évident qu'il y a dans ces maladies des poisons pour lesquels les cellules de l'individu même, ou des individus de la même espèce, ont des groupes *haptophores*. Il s'agit, suivant la nomenclature de M. Ehrlich, d'une production d'autotoxine ou d'isotoxine. »

M. Metchnikoff propose d'introduire les antitoxines spécifiques dans l'organisme de l'homme afin d'arriver à exercer une influence sur ses autotoxines.

Naturellement, il est nécessaire pour cela de produire chez une autre espèce animale des sérums antitoxiques, en leur injectant du sérum toxique.

Ces recherches pourront être couronnées de succès si l'on parvient à acquérir une connaissance spéciale des parties composantes des sérums de divers animaux et de leurs rapports réciproques.

La spermotoxine, découverte par MM. Landsteiner<sup>2</sup> et

1. *Revue générale des Sciences*, 1901, 15 janvier.

2. *Centralbl. f. Bakter*, 1899.



Metchnikoff<sup>1</sup>, se prête à cette étude, parce que les spermatozoïdes extraits récemment d'un testicule, avec leur flagelle très mobile, permettent de constater facilement les influences des différentes toxines que l'on fait agir sur eux.

Dans nos recherches, nous avons produit d'abord chez des cobayes un sérum toxique pour les spermatozoïdes de lapin. Suivant la méthode inaugurée par le professeur Metchnikoff, les testicules, soigneusement débarrassés des traces de sang, sont coupés en petits morceaux, pilés dans un mortier avec une petite quantité d'eau physiologique, puis passés à travers un tamis métallique. On injecte l'émulsion ainsi obtenue à des cobayes.

Afin d'opérer toujours avec un sérum spermotoxique d'une force déterminée, nous avons cherché à régler les injections de spermatozoïdes à nos cobayes, de façon à avoir, à la fin de l'immunisation, un sérum pouvant immobiliser complètement, dans l'espace de trois minutes, les spermatozoïdes récemment extraits des testicules d'un lapin neuf.

Chez quelques cobayes, le sérum acquiert vite, après l'injection de doses relativement faibles, ce degré prononcé de toxicité. Les autres mettent plus de temps pour fabriquer de la spermotoxine de cette force; mais chez quelques individus, nous ne sommes jamais parvenu, malgré des injections répétées de fortes doses d'émulsion testiculaire de lapin, à produire une spermotoxine aussi active. Ces cobayes furent éliminés de nos expériences.

Nous savons, par les travaux des auteurs précédemment cités, qu'un sérum doit sa puissance toxique pour une espèce de cellules à deux substances :

1° Au complément (cytase) facile à détruire ;

2° A la substance intermédiaire, suivant la nomenclature de M. Ehrlich, sensibilisatrice selon M. Bordet.

En chauffant à 56°, on détruit le complément; il reste la substance intermédiaire, qui, seule, ne peut pas produire un effet toxique.

Il s'agissait de déterminer en premier lieu si, pour la substance intermédiaire de la spermotoxine produite chez les cobayes à la suite des injections mentionnées plus haut, le sérum

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 6.

des autres animaux peut fournir des compléments réactifs.

Voici comment je procédais : je chauffais le sérum spermotoxique pendant une heure à 56°, et j'ajoutais ensuite du sérum frais de l'animal que j'examinais.

Le sérum spermotoxique, chauffé, inactif, du cobaye, et le sérum complémentaire d'animal neuf étaient mélangés dans les proportions de 1/15 jusqu'à 1/20, Metchnikoff<sup>1</sup> ayant trouvé que la substance intermédiaire et le complément agissent au maximum dans ces proportions.

J'ai examiné le sérum de 8 cobayes neufs, de différentes tailles et de différents sexes : tous ces sérums se sont montrés capables de réactiver la spermotoxine chauffée, car si on faisait le mélange à la façon décrite plus haut, les spermatozoïdes étaient immobilisés exactement au bout du même temps qu'ils l'étaient par du sérum spermotoxique actif, témoin.

Mais l'espoir de trouver, chez tous les individus de la même espèce, des compléments qui réactiveraient toujours de la même manière les corps intermédiaires de la spermotoxine ne devait pas se justifier.

Ainsi, sur onze lapins que j'ai examinés, chez cinq seulement le sérum se montra capable de réactiver ma spermotoxine chauffée aussi bien que le faisait le sérum de cobaye neuf. Quant aux six autres lapins, leur sérum possédait un pouvoir complémentaire (cytasique) très peu prononcé ; ainsi, dans quatre cas l'immobilisation des spermatozoïdes ne survint qu'au bout de 1 à 2 heures ; dans deux autres cas, les spermatozoïdes manifestèrent encore après vingt heures une mobilité aussi accentuée que dans le sérum de lapin seul.

Naturellement, sur ces préparations, déjà vieilles de vingt heures, les mouvements des flagelles étaient beaucoup plus lents et les spermatozoïdes étaient agglutinés.

Les sérums d'oie, de cheval et d'homme contiennent des compléments qui réactivent la spermotoxine chauffée en trois à cinq minutes.

Au contraire, le sérum de trois souris que j'ai examinées ne manifestait point d'action alexique avec la substance intermédiaire de la spermotoxine.

Les sérums neufs des animaux mentionnés, ajoutés seuls

1. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1900, n° 9.



à des spermatozoïdes, montraient une très faible action toxique, perceptible seulement après plusieurs heures.

Une spermotoxine naturelle assez forte a pu être constatée dans le sang de deux rats. Ici les spermatozoïdes étaient déjà complètement immobilisés après 20 minutes de séjour dans du sérum seul.

Le sang de pigeon s'est comporté dans 2 cas comme le sang des rats.

Une action encore plus toxique sur les spermatozoïdes appartient au sérum de chien. Dans ce sérum, après quinze minutes, on ne peut plus constater la moindre mobilité.

Quand on fait un mélange d'un de ces trois sérums neufs avec du sérum spermotoxique chauffé, dans la proportion de 20/1, on n'aperçoit aucune action. Et cependant ces sérums par eux-mêmes étaient très toxiques, car ils immobilisaient les spermatozoïdes, comme nous l'avons déjà dit, en 15 à 20 minutes.

Mais si le sérum neuf était ajouté en quantité suffisante à la spermotoxine, l'immobilisation des spermatozoïdes survenait en un temps extrêmement court.

La toxicité naturelle des sérums neufs vis-à-vis des spermatozoïdes n'était du reste pas constante. Par exemple, le sérum d'un troisième rat, comparé à celui des deux rats précédemment examinés, présentait une action toxique très faible vis-à-vis des spermatozoïdes.

Le sérum d'un cheval montrait bien la même action alexique que le sérum de l'animal déjà examiné, mais le second différait du premier en ce sens qu'il possédait une action toxique vis-à-vis des spermatozoïdes, qu'il immobilisait complètement en une heure.

J'ai trouvé aussi dans deux cas, chez le même individu, un pouvoir toxique variable. Par exemple, dans un cas, les spermatozoïdes, mis dans du sérum d'oie, étaient encore mobiles après vingt heures; or, le sérum du même animal, qui n'avait pas été traité, immobilisait un mois après les spermatozoïdes en dix minutes.

Dans le second cas, le sérum d'un homme réactivait la substance intermédiaire de ma spermotoxine avec une intensité remarquable. Huit semaines plus tard, dans le sérum de la même personne, on n'a plus pu constater la moindre action alexique.

## II

## SUBSTANCES ANTI-INTERMÉDIAIRES ET ANTICOMPLÉMENTS

Si l'on injecte à un lapin du sérum d'un cobaye, dont le sérum est toxique pour les spermatozoïdes de lapin, on peut, comme l'a démontré M. Metchnikoff, produire chez ce lapin une antispermotoxine, même si celui-ci a été préalablement châtré.

On pouvait se demander si cette antispermotoxine n'est pas autre chose qu'une anticytase, semblable à celle que l'on obtient par injection du sérum normal, ou bien s'il s'agit dans ce cas d'une véritable substance antisensibilisatrice ou anti-intermédiaire.

Pour résoudre cette question, j'ai injecté à des animaux de différentes espèces du sérum spermotoxique que j'ai déjà décrit. En même temps j'ai injecté à d'autres animaux, de même espèce, des doses égales de sérum de cobaye neuf.

J'ai commencé par des souris; leur sérum est naturellement très faiblement spermotoxique et il est complètement incapable de réactiver une spermotoxine chauffée. J'ai injecté à deux souris du sérum spermotoxique, à deux autres du sérum de cobaye normal. Chaque souris recevait à chaque injection 2 c. c. de sérum; les injections étaient pratiquées tous les cinq jours, et on en a fait quatre en tout.

Pour abréger, je désignerai les souris injectées avec du sérum spermotoxique avec la lettre A, et les témoins avec la lettre B. 14 jours après la première injection, l'action antispermotoxique des souris traitées était encore faible. Après le 21<sup>e</sup> jour, le pouvoir antispermotoxique était à son maximum. Le sérum recueilli à ce moment chez les animaux A et les animaux B fut mélangé avec une quantité égale de sérum toxique de cobaye, qui tuait les spermatozoïdes en 3 minutes. Une différence essentielle se manifesta déjà dès les premières minutes dans ces deux préparations. Dans le mélange du sérum A avec le sérum spermotoxique, les spermatozoïdes se montrent beaucoup plus mobiles que dans le mélange du sérum B avec



le sérum spermotoxique ; ce dernier tuait les spermatozoïdes des lapins en 3 minutes.

Après une heure de séjour dans le mélange A, beaucoup de spermatozoïdes se montraient encore mobiles, alors que le nombre de spermatozoïdes mobiles était infiniment plus faible dans le mélange B.

Après deux heures, tous les spermatozoïdes du mélange B étaient immobiles, tandis que dans le mélange A ils conservaient encore leur mobilité sur beaucoup de points.

Il me fut impossible de produire une antispermotoxine plus forte chez ces souris. Ainsi, malgré une cinquième injection que je leur ai faite le 30<sup>e</sup> jour après la première injection, le sérum des souris A pouvait retarder de 15 minutes l'action d'un sérum spermotoxique agissant en 2 minutes, les 2 sérums étant mélangés à parties égales. Le sérum des souris B, mélangé avec une quantité égale du même sérum spermotoxique, immobilisait complètement les spermatozoïdes dans 10 minutes.

Je voudrais aussi mentionner ce fait que l'antispermotoxine des souris A exerçait également une forte action sur la spermotoxine contenue naturellement dans le sérum de chien. Dans le sang du chien seul, les spermatozoïdes étaient immobilisés complètement après une demi-heure, mais ils se montraient encore très mobiles après une demi-heure dans un mélange contenant parties égales de sérum des souris injectées avec de la spermotoxine et du sérum de chien.

Chez des pigeons et des rats, je n'ai pas réussi à produire des antispermotoxines aussi actives. J'ai fait à un pigeon et à un rat, dans l'espace de quinze jours, trois injections de 2 c. c. de sérum spermotoxique, puis à deux témoins — pigeon et rat — j'ai injecté autant de sérum de cobaye normal.

Le sérum de ces quatre animaux manifestait à lui seul, au commencement de mes recherches, une assez forte action toxique sur les spermatozoïdes. Après 15 à 20 minutes, ceux-ci étaient déjà complètement immobilisés. Le pigeon A, traité avec du sérum spermotoxique, donna après 14 jours un sérum qui, mélangé avec une quantité égale de sérum spermotoxique, retardait l'action de ce dernier de 27 minutes. Le sérum spermotoxique de cobaye, que j'employais pour cette recherche, immobilisait les spermatozoïdes en 5 minutes. Le

sérum du pigeon qui me servait de témoin, qui a reçu la même quantité de sérum d'un cobaye normal, était seulement en état de retarder de 10 minutes l'action du même sérum toxique.

Chez les rats, j'ai cru constater un effet antitoxique, pouvant retarder de 2 minutes seulement l'action du sérum spermotoxique; mais je n'ai pu constater ce retard que pour le sérum du rat, auquel j'avais injecté du sérum spermotoxique. Le rat témoin, injecté avec du sérum de cobaye normal, ne paraissait pas exercer une action antitoxique.

J'ai pu constater également ce fait curieux, que, à la suite des injections faites aux rats et aux pigeons, leur sérum, employé seul, diminuait fortement de toxicité vis-à-vis des spermatozoïdes de lapin, 15 jours après.

De même, les sérums qui, avant l'injection, pouvaient immobiliser les spermatozoïdes complètement en 15 à 20 minutes, ne parvenaient au même résultat, après les injections, qu'au bout de 1 heure ou 1 heure et demie.

Mais les pigeons ont fait exception à cette règle, car dans le sérum du pigeon injecté avec de la spermotoxine, les spermatozoïdes restaient mobiles encore pendant un temps plus long que dans celui du pigeon injecté avec du sérum de cobaye.

J'ai réussi à obtenir la plus forte antispermotoxine chez un lapin châtré qui avait reçu en 14 jours 3 injections, à raison de 5 c. c. de sérum spermotoxique par injection. Un lapin témoin, également châtré, a reçu en même temps la même quantité de sérum d'un cobaye neuf. J'ai pris pour cette expérience 2 lapins dont le sérum était capable de réactiver complètement et rapidement la spermotoxine chauffée à 55°.

Le mélange de sérum de lapin neuf avec de la spermotoxine chauffée, fait dans la proportion de 15/1, immobilise les spermatozoïdes avec la même intensité et aussi rapidement que le sérum spermotoxique seul, non chauffé.

J'ajouterai qu'on ne pouvait pas constater la moindre action spermotoxique dans les sérums seuls de ces deux lapins.

Après le traitement, le lapin injecté avec du sérum spermotoxique fournit une antispermotoxine qui annulait presque complètement les effets de la spermotoxine; car, si l'on mélangeait le sérum de ce lapin avec la même quantité de sérum d'un



cobaye, tuant les spermatozoïdes de lapin en 3 minutes, ceux-ci restaient encore, après 4 heures, mobiles, dans plusieurs parties de la préparation.

Dans le sérum de l'animal témoin, qui n'était pas chauffé, on ne pouvait apercevoir aucune action antispermotoxique; mais si l'on chauffait ce sérum témoin, les spermatozoïdes restaient une heure encore mobiles dans le mélange avec la même quantité de sérum toxique de cobaye. En même temps on pouvait reconnaître que les sérums des 2 lapins avaient perdu, après les injections, une grande partie de l'action complémentaire qu'ils possédaient auparavant, vis-à-vis du sérum spermotoxique inactivé de cobaye.

Dans ce mélange, les spermatozoïdes perdaient complètement leur mobilité dans l'espace de 1 heure et demie à 2 heures; tandis que, avant les injections, ils perdaient leurs mouvements déjà au bout de 2 à 3 minutes, dans le mélange d'une même quantité de sérum spermotoxique avec du sérum de 2 lapins normaux.

Pour trouver une preuve directe que dans le sérum d'un lapin, auquel on injecte du sérum spermotoxique, il se forme aussi une substance anti-intermédiaire, je fis l'expérience suivante.

Comme nous l'avons fait précédemment, nous désignerons par la lettre A, le sérum de l'animal injecté avec le sérum spermotoxique de cobaye, et avec la lettre B le sérum de l'animal injecté avec du sérum de cobaye non traité.

Les sérums des 2 lapins inactivés furent mélangés chacun avec la même quantité de sérum spermotoxique, aussi inactivé, d'un cobaye, qui auparavant, à l'état normal, immobilisait dans 3 minutes les spermatozoïdes de lapin.

A chacun de ces deux mélanges, j'ajoutais une même quantité de spermatozoïdes d'un lapin neuf, et, comme complément, dans un cas, j'ajoutai aussi une grande quantité de sérum d'un troisième lapin neuf, dont j'avais observé la parfaite action complémentaire avec du sérum spermotoxique inactivé de cobaye.

Au mélange des sérums inactivés, j'ajoutai, dans le deuxième cas comme complément, des sérums nouveaux d'autres espèces d'animaux, d'un cheval et d'une oie, qui possédaient aussi un fort pouvoir complémentaire.

Dans le mélange avec le sérum A, la mobilité des spermatozoïdes du lapin était encore assez bien conservée après 2 heures ; dans le mélange avec le sérum B, ils avaient déjà perdu toute trace de mobilité en 5 minutes. Les sérums d'un cheval ou d'une pie qui étaient à ma disposition, comme complément, pendant cette dernière expérience, étudiés pour leur action toxique et agglutinante à l'égard des spermatozoïdes, les immobilisaient complètement dans l'espace de 40 à 60 minutes.

C'est pourquoi je ne pouvais pas constater, entre les deux mélanges des sérums A et B, une différence de temps aussi grande que lorsque j'employais le complément de lapin ; mais j'ai vu cependant, après 20 minutes, dans le mélange A, une remarquable mobilité des spermatozoïdes, tandis que dans le mélange B, la mobilité avait complètement cessé au bout de 15 à 20 minutes.

Si l'on prenait le sérum d'oie au lieu de sérum de cheval, on pouvait toujours trouver le même rapport.

### III

#### ANTI-AGGLUTININE ET ANTISUBSTANCE INTERMÉDIAIRE

Je voudrais mentionner encore un fait qui s'est produit, surtout, dans les mélanges avec les sérums des deux lapins A et B.

Le sérum des cobayes rendus spermatotoxiques avait à l'égard des spermatozoïdes du lapin non seulement une toxicité assez forte, empêchant leurs mouvements et les immobilisant d'une façon complète au bout de trois minutes, mais, en plus, son action était aussi extrêmement agglutinante.

Lorsque nous ajoutâmes à ce sérum du sérum du lapin B, les spermatozoïdes s'agglutinèrent d'abord, puis ils s'immobilisèrent en masse ; mais si nous ajoutions, au même sérum toxique et agglutinant du cobaye, du sérum de lapin A, il devenait impossible d'observer la moindre trace d'agglutination,



et lorsque les spermatozoïdes furent enfin immobilisés par la spermotoxine, ils ne se sont pas agglutinés.

Il est évident que, dans le sérum de lapin, il s'était formé, à côté de la substance intermédiaire, une anti-agglutinine qui était en état d'avoir raison des actions réunies de la substance anti-intermédiaire et de l'anticomplément.

Ce parallélisme évident entre l'anti-agglutinine et la substance intermédiaire, on le pouvait observer dans toutes les préparations, sans exception. Ces anti-agglutinines, formées parallèlement avec les substances intermédiaires, n'avaient, du reste, aucune influence sur les agglutinines qui se trouvaient dans les sérums naturellement toxiques de l'oie et du cheval mentionnés plus haut.

Dans toutes les préparations dans lesquelles il s'agissait d'un mélange de deux différentes espèces de sérum, on pouvait observer, dans un temps plus ou moins court, la formation de sédiments granuleux d'albumine, surtout si on ajoutait, au sérum de l'animal traité, du sérum avec lequel cet animal avait été injecté pour produire les substances anti-intermédiaires et les anticompléments.

#### CONCLUSIONS

De l'ensemble des faits rapportés plus haut se dégage cette conclusion que, à la suite d'immunisation des animaux avec du sérum spermotoxique, il se forme chez ces derniers une substance anti-intermédiaire (antifixatrice).

En terminant, je tiens à témoigner à M. le professeur Metchnikoff toute ma gratitude pour son bienveillant concours pendant toute la durée de mon travail.

---

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'AUTO-PURIFICATION MICROBIENNE DU VAGIN

## Expériences sur les animaux.

PAR LE D<sup>r</sup> CAHANESCO (DE BOTUSANI).

---

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

---

Sous le nom d'autopurification (Selbstreinigung) microbienne du vagin, MM. Menge et Krönig<sup>1</sup> désignent l'intéressant phénomène qu'ils ont observé chez la femme, à savoir que le vagin — même dans l'état normal, c'est-à-dire non puerpéral — peut se débarrasser des microbes qui y sont arrivés soit accidentellement, soit expérimentalement. Ce phénomène serait dû, soit à l'antagonisme des microbes autochtones avec les microbes pathogènes qui sont introduits, soit à l'acidité du mucus vaginal de la femme, acidité due à la présence de l'acide lactique, qui n'est à son tour qu'un produit de ces mêmes microbes autochtones. Autrement dit, le mucus vaginal serait un milieu favorable pour certains microbes qui se trouveraient habituellement dans le mucus « normal » (Doederlein), et ces microbes lutteraient à leur tour contre les microbes pathogènes qui pourraient y arriver accidentellement.

Il était intéressant de voir si un phénomène analogue se produisait aussi chez les animaux. C'était le but du travail qui nous fut d'ailleurs recommandé par notre cher et illustre maître, le professeur Metchnikoff. Il s'agissait donc de savoir : (a) Existait-il chez les animaux un phénomène analogue d'autopurification microbienne ? Et en cas affirmatif : (b) A quoi ce phénomène est-il dû, à un antagonisme microbien ou à autre chose ?

Les expériences analogues sur les animaux ont déjà été faites par Stroganoff<sup>2</sup>, mais dans les traductions allemandes et

1. MENGE ET KRONIG, *Bactériologie des weiblichen Geschlechtskanales*.

2. STROGANOFF, *Recherches bactériologiques sur le canal génital de la femme dans les diverses périodes de la vie*, 1893. — STROGANOFF, *Zur Bacteriologie des weibl. Geschlechtskanales*, *Centralblatt für Gynäkologie*, 26 septembre 1895.

françaises, nous n'avons pu trouver ni les méthodes employées, ni les résultats précis auxquels il était arrivé. Aussi étions-nous obligé de recommencer de toutes pièces ces expériences, guidé par le très remarquable travail de Menge et Krönig.

Les animaux sur lesquels nous avons fait nos expériences ont été : la chienne, le cobaye, la lapine, et, pour avoir une plus grande quantité de mucus vaginal, nous nous sommes servi d'une jument en chasse.

Les microbes que nous avons employés pour l'expérimentation étaient les suivants : *Micrococcus prodigiosus*, *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Bacillus pyocyaneus*, soit séparément, soit simultanément.

Nous tâchions d'employer autant que possible les microbes que nous n'avions pas trouvés, par nos recherches préalables, dans la flore microbienne du mucus vaginal de l'animal soumis à l'expérimentation — tout en donnant la plus grande importance au staphylocoque et au streptocoque, qui sont les microbes qui nous intéressent le plus.

Pour cultiver les microbes trouvés dans le mucus vaginal, nous nous sommes servi des méthodes courantes pour les aérobies et des milieux habituels : bouillon, gélose, gélatine, pommes de terre. Pour les anaérobies, nous avons adopté la méthode employée par MM. Veillon et Zuber.

Il va sans dire que nous ne nous sommes pas occupé d'isoler tous les microbes trouvés à l'intérieur des organes génitaux des différents animaux de l'expérience. Ce n'était pas notre but et cela nous aurait mené trop loin. Mais nous nous sommes toujours appliqué à isoler les microbes que nous avons trouvés *constamment* à différentes reprises sur le même animal, et surtout sur la même espèce animale, car seuls ceux-ci auraient pu jouer un certain rôle en cas d'antagonisme (à l'instar du bacille de Doederlein chez la femme).

Pour les anaérobies, la méthode Veillon paraît être la meilleure de toutes que nous connaissons jusqu'ici. Elle a seulement l'inconvénient de demander trop de matériel et trop de temps, et ne saurait être employée que pour les cas où la recherche des anaérobies est le but principal, et non pas, comme dans notre cas, d'une importance secondaire.



Pour l'inoculation des microbes dans le vagin, nous nous sommes servi de différentes méthodes. Au commencement nous injections 1 c. c. d'une culture de 24 heures dans du bouillon, à l'aide d'une seringue de Pravaz munie d'un petit tube à bords mousses, pour ne pas léser la paroi vaginale. Cette méthode s'est montrée défectueuse, car assez souvent l'animal évacuait la presque totalité du liquide inoculé, soit par des contractions des muscles du vagin, soit par des mouvements du corps.

Nous avons plus tard adopté une autre méthode qui nous paraissait meilleure : à savoir, le badigeonnage de la muqueuse avec de la culture faite sur plaques, à l'aide d'un pinceau stérilisé dans un peu d'eau, afin que les poils restent doux, pinceau qui fut introduit à travers un spéculum en verre stérilisé.

Pour isoler les microbes du mucus, nous lavions dans du bouillon stérilisé le pinceau chargé de ce mucus, puis nous l'essuyions sur une série des tubes inclinés de gélose, gélatine ou pomme de terre. Pour les anaérobies, une goutte du premier bouillon fut diluée dans une série des tubes Liborius.

A chaque expérience nous avons pris le soin de noter la réaction du mucus vaginal. Les préparations microscopiques faites aussi à l'aide des pinceaux stériles furent fixées avec éther et alcool, et colorées, soit à la thionine, soit au Gram-eosin ou Gram et hémateïne.

Pour savoir si le mucus vaginal, comme tel, est en état de tuer ou d'empêcher la végétation des microbes, nous avons agi de la façon suivante : chez les petits animaux qui ne pouvaient pas nous procurer une grande quantité de mucus, nous essuyions leurs parois vaginales à l'aide du pinceau ; puis, avec le pinceau chargé de mucus, nous badigeonnions les plaques de culture, et sur ces plaques nous avonsensemencé les microbes de l'expérience.

Toujours ils ont bien poussé en même temps que les microbes qui se trouvaient déjà dans ce mucus. Plus tard, comme nous avons eu l'occasion de trouver une jument en chasse qui pouvait nous procurer une plus grande quantité de mucus vaginal, nous nous en sommes servi pour les expériences 15-16.

Pour étudier l'antagonisme microbien — *in vitro* — nous avonsensemencé les microbes isolés — surtout ceux qui se trouvaient régulièrement dans le vagin des animaux. Nous les avons

ensemencés en même temps que les microbes de l'expérience sur divers milieux de culture.

Après ce court exposé des méthodes employées, qu'il nous soit permis de donner les résultats auxquels nous sommes arrivés. Ces résultats ne sont pas tout à fait identiques avec ceux trouvés par Menge et Krönig chez la femme.

Les voici :

1. Dans le vagin des femelles se produit un phénomène analogue à celui trouvé par Menge et Krönig, Stroganoff, chez la femme, c'est-à-dire un certain degré d'*autopurification microbienne*. Cette autopurification est relativement faible, diffère d'animal à animal, de microbe à microbe.

2. Elle est le résultat de différents phénomènes : le *sens du courant de la sécrétion* dirigé vers l'entrée du vagin, une *desquamation épithéliale* continuelle. Par ces deux moyens les microbes sont entraînés mécaniquement vers la vulve et vers l'extérieur ; mais surtout c'est *l'action des leucocytes*. Ces derniers agissent et comme *phagocytes*, et peut-être aussi par des substances toxiques qu'ils élaborent à l'intérieur du vagin.

Le vagin répond toujours, par une leucocytose plus ou moins forte, à l'introduction des microbes. Ces leucocytes viennent directement à travers la paroi vaginale, ce que l'on peut observer sur les coupes faites quelques heures après l'introduction des microbes. Elle peut aboutir à l'anéantissement total de ceux-ci ; souvent cependant cette disparition complète n'est qu'*apparente*, c'est-à-dire que dans les premières heures ou les premiers jours, le nombre des microbes diminue considérablement : sur les préparations on n'en trouve que peu ou pas du tout ; de même sur les milieux de culture ne poussent que peu de colonies ; mais si on examine l'animal, 8 ou 10 jours après, on retrouve les microbes inoculés qui paraissaient disparus, et dorénavant ils peuvent constituer une partie constante de la flore microbienne du vagin. Ceci est vrai surtout pour les microbes pyogènes, staphylococcus et streptococcus.

En somme, cette disparition dans les premières heures ou les premiers jours après l'expérience *peut* être complète ou le *paraître*, et, dans ce dernier cas, les microbes restés vivants constituent des parasites permanents du vagin.

De tous les microbes que nous avons inoculés, le *prodigiosus*

disparaissait le plus tôt et nous ne pouvions plus le retrouver; il paraît qu'en effet le mucus vaginal *frais* a une certaine influence sur la vitalité de ce microbe (voir expérience 15).

3. Quoique, comme nous l'avons déjà dit, notre but principal ne fût pas la recherche des microbes du vagin chez les animaux, nous avons pu pourtant nous convaincre, par différentes prises faites, que chez les animaux comme chez la femme la quantité des microbes et d'espèces microbiennes est de beaucoup plus grande à l'entrée du vagin que dans la profondeur. Cependant nous n'avons jamais trouvé stériles les culs-de-sac vaginaux. Le mucus de la profondeur contenait, en même temps que divers microbes, des leucocytes peu nombreux et des cellules épithéliales.

4. Nous n'avons pu trouver — *in vitro* — aucun antagonisme des microbes isolés du vagin avec ceux que nous avons introduits expérimentalement. De même, dans les préparations microscopiques, nous n'avons pas pu constater la prédominance d'une espèce microbienne sur les autres.

5. Le mucus vaginal chez la jument, comme tel, ne s'est pas montré microbicide.

6. La réaction du mucus vaginal chez les animaux de l'expérience était toujours alcaline.

Comme on le voit, ces résultats diffèrent en quelque sorte de ceux trouvés chez la femme par les auteurs cités. Ils nous

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition définitive des microbes introduits.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Cellules épithéliales en grand nombre, dont les unes couvertes de microbes : diplococcus (107) diplococcus géant (108), diplobacillus. Petits amas extracellulaires. Par-ci par-là un leucocyte polynucléaire.	Immédiatement après l'inoculation, à peu près exclusivement le coccus introduit. Cellules épithéliales. Peu de leucocytes. 3 heures après. Même aspect. Phagocytes peu nombreux.	∞



engageant à recommencer les mêmes expériences chez la femme, ce qui sera le but d'un second travail.

*Expérience I.* — Chienne à laquelle nous avons introduit dans le vagin 1 c. c. d'une culture de 24 heures de *Staphylococcus aureus*, le 13 février 1901 (voir le détail p. 846).

*Observations.* — La flore bactérienne préexistante reste la même après l'introduction du staphylocoque ; celui-ci ne se trouvait pas antérieurement dans le vagin de cet animal.

40 heures après, les colonies du streptococcus autochtone paraissent prédominer sur celle du staphylocoque doré. Le nombre des colonies de ce dernier a sensiblement diminué. Cette diminution est progressive jusqu'au 18 février (5 jours après). Ce jour, la prise donne un nombre de colonies staphylococciques sensiblement augmenté. Dès ce moment je trouve toujours des colonies du staphylococcus aureus.

Le 23 février, je fais une injection dans le péritoine d'un cobaye avec le staphylocoque doré, isolé du mucus vaginal de cette chienne le 20 février. Le cobaye meurt et nous trouvons dans la sérosité péritonéale (l'autopsie fut faite 6 heures après la mort) un mélange de *b. coli* et staphylocoque doré. Nous répétons le 16 mars la même expérience sur un lapin qui est mort de staphylococcie. Nous en déduisons que la virulence n'est pas diminuée à l'intérieur du vagin.

*Expérience II.* — Chienne à laquelle nous avons inoculé 1 c. c. d'une culture pure de *Bacillus prodigiosus* le 24 février 1901.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition complète et définitive.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Grand nombre de cellules épithéliales. Peu de microbes, dont la plupart petit diplococcus (107). Grand diplococcus (108). Par-ci par-là petits amas de coccus et de bacilles en dehors des cellules. Peu de phagocytose.	Immédiatement après, présence à peu près exclusive du bacille injecté. Le 1 <sup>er</sup> mars (5 jours après) forte leucocytose. Peu de microbes, dont la plupart staphylococcus.	140 heures après l'inoculation.

*Observations.* — La flore vaginale reste la même avant et après l'inoculation. Nous avons isolé les microbes trouvés et nous les avons mêlés avec le prodigiosus dans différents milieux : bouillon, gélose, pomme de terre. Toujours ils se sont bien développés et n'ont pas empêché le développement du prodigiosus. Nous n'avons donc pas trouvé — *in vitro* — un antagonisme microbien.

*Expérience III.* — Chienne chez laquelle, après avoir constaté la disparition du *B. prodigiosus* inoculé le 24 février, nous avons de nouveau introduit le 5 mars 1 c. c. de culture du même microbe.

Réaction amphotère les 5 et 6 mars. Les jours suivants toujours alcaline.

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition totale et complète.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Forte leucocytose. Phagocytes englobant des cocci et peu de bacilles. Très peu de microbes extra-cellulaires.	Immédiatement après, gr. nombre de microbes inoculés. 24 heures apr. leucocytose. Cellules épithéliales phagocytose. Grand nombre de microbes <sup>1</sup> très divers extra-cellulaires. Le 7/m. Le nombre des microbes fortement diminué.	96 heures après.

*Expérience IV.* — Cobaye A, dans le vagin de laquelle on a introduit 1 c. c. de culture dans bouillon de *B. prodigiosus* le 24 mars.

Réaction alcaline.

1. En retirant le pinceau nous avons touché l'entrée du vagin, ce qui explique le grand nombre de microbes trouvés dans la préparation.

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+ Peu de mi- crobes.	Grand nombre de microbes sur- tout un petit bacille extra-cel- lulaire. Coccus en amas et en courtes chaî- nettes. Leucocy- tose. Phagocy- tose. Cellules épithéliales as- sez nombreuses couvertes de mi- crobes.	Même aspect qu'auparavant.	30 heures après.

*Observations.* — La culture fut expulsée en plus grande partie. La flore bactérienne ne diffère pas beaucoup avant et après l'expérience. 30 heures après nous ne trouvons plus de prodigiosus. Les préparations montrent : leucocytose, peu de microbes, par-ci par-là un diplococcus. Peu de phagocytes. Grand nombre de cellules épithéliales.

*Expérience V.* — *Cobaye B.* — Dans le vagin de laquelle nous avons introduit 1 c. c. d'une culture de *Streptococcus pyogenes*.

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES	
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS
+	+ Streptococcus en grand nombre.	Leucocytose. Peu de microbes.	Une heure après l'inoculation, forte leucocytose, forte phagocytose. Les phagocytes sont bourrés de coccus. Trois heures après, le streptococcus se trouve à peu près exclusivement à l'intérieur des pha- gocytes. Nous tuons l'ani- mal pour faire des coupes.



*Observation.* — Femelle au commencement de la grossesse. Dans les préparations, infiltration leucocytaire de la paroi vaginale.

*Expérience VI.* — *Cobaye C.* — Badigeonnage de la muqueuse vaginale au moyen d'un pinceau chargé d'une culture pure de *Streptococcus pyogenes* le 28 mai 1904.

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT dans différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+ Surtout streptococcus.	Peu de cellules épithéliales, leucocytes. Peu de bactéries, surtout un bacille court qui ne prend pas le Gram. Pas de phagocytose.	30' après. Forte leucocytose. Phagocytose très active, 1 h après. Le nombre de microbes en dehors des cellules est très diminué.	∞ Le streptococcus reste comme hôte stationnaire à l'intérieur du vagin et nous le retrouvons 8, 10, 15 jours après.

*Expérience VII.* — *Cobaye D.* — Inoculation du *Streptococcus pyogenes*.

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT dans différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Peu de microbes, surtout bacilles. Leucocytes polynucléaires. Pas de phagocytose. Cellules épithéliales peu nombreuses.	4 heure après l'inoculation grand nombre de cellules épithéliales. Présence à peu près exclusive du streptococcus pyogenes. Pas de leucocytes. On peut constater un certain groupement des microbes semblable à une agglutination.	∞

2 heures après l'inoculation, hyperleucocytose. Phagocytose très intense. Peu de microbes en dehors des cellules. Les cellules elles-mêmes sont pleines de streptocoques. Pas d'autres microbes dans le champ visuel.

4 heures après, même aspect.

24 heures après, leucocytose. Relativement peu de phagocytes. Peu de microbes. Présence d'un bacille fusiforme.

48 heures après, les préparations microscopiques montrent peu de microbes, mais les plaquesensemencées nous donnent encore des colonies peu nombreuses de streptocoques.

8 jours après, nous sommes surpris de la grande quantité de streptococcus que nous trouvons et dans les préparations et sur les plaquesensemencées. L'animal se porte bien.

Dorénavant nous trouvons constamment les streptocoques à l'intérieur du vagin de cet animal, le mucus vaginal reste trouble et riche en leucocytes.

*Expérience VIII.* — *Lapine* à laquelle nous avons injecté une culture pure de *Streptococcus pyogenes*, le 10 avril 1901. Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+ Peu de micro- bes.	+ streptococcus.	Cellules épi- théliales. Leu- cocytes. Micro- bes peu nom- breux.	3 heures après l'inoculation, forte leucocy- tose. Peu de phagocytose. Même aspect le lendemain.	8 jours après nous retrouvons le streptoco- que que nous n'avions pas trouvé avant l'inoculation.

*Observation.* — Le lapin ne se prête pas très bien à ces expériences à cause de sa contention difficile. Aussi nous avons renoncé et nous avons recommencé nos expériences sur les cobayes.

*Expérience IX.* — *Cobaye* 82. — Badigeonnage de la muqueuse avec une culture pure de *Bacillus pyocyaneus*; une heure après nouveau badigeonnage avec une culture de *staphylococcus*, le 19 février 1901.

## Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Sécrétion abondante fluor. Sous le micros- cope, grand nombre de mi- crobes dont les uns prennent le Gram, les autres se décolorent. Un bacille fusi- forme se colo- rait seulement aux bouts. Forte leucocytose. Phagocytose. Grand nombre de cellules épi- théliales.	Immédiate- ment après, le champ visuel est couvert du ba- cille inoculé. 1 heure après, les bacilles sont groupés en pe- tits amas agglu- tinés. Leucocy- tose. Peu de pha- gocytes. Nous inoculons le streptococcus.	∞

2 heures après, même aspect, en plus le staphylococcus en grand nombre et présentant le même groupement que le pyocyanus.

4 heures après, même aspect. Phagocytose plus prononcée. Nous examinons chaque jour jusqu'au 29 avril le mucus vaginal et nous retrouvons toujours le *pyocyanus* et le *staphylococcus* en assez grande quantité. Les autres microbes que nous y avons trouvés restent dans le même état. L'animal se porte bien. C'est seulement le 12 mai que nous ne retrouvons plus le *pyocyanus*, pendant que le *staphylococcus* s'y trouve toujours. A cette date nous avons tué l'animal.

Expérience X. — Cobaye 97, badigeonnage de la muqueuse avec culture prise de *Bacillus pyocyanus*, le 12 avril 1901.

## Réaction alcaline.

Observation. — La leucocytose persiste en même temps que l'on trouve d'autres microbes et le pyocyanique 8-10 jours après. Après le dixième jour, nous n'avons plus examiné l'animal jusqu'au 23 mai, c'est-à-dire plus d'un mois, date à laquelle nous avons soumis le même animal à une autre expérience (voir expér. 14).



RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Cellules épithéliales peu nombreuses, microbes peu nombreux, leucocytes en petit nombre.	Immédiatement après, le champ visuel est couvert par le b. pyocyaneus, peu de leucocytes. 3 heures après forte leucocytose, phagocytose relativement peu accentuée. 24 heures après, le nombre des microbes est de beaucoup diminué, leucocytose.	8

Nous avons trouvé quelques colonies du pyocyanique, ce qui démontre combien cette autopurification est lente.

*Expérience XI.* — Cobaye 59, auquel nous avons introduit le 24 avril une culture prise de *Staphylococcus pyogenes aureus*. Réaction alcaline.

ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES	
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS
+	—	Pas de microbes dans les préparations. Très peu de leucocytes. Cellules épithéliales.	3 heures après l'inoculation, nous trouvons une forte leucocytose et phagocytose. 24 heures, leucocytose. Peu de phagocytes. 3 jours après, forte desquamation épithéliale. Leucocytose. Peu de phagocytes. Microbes peu nombreux, mais toujours la présence de staphylococcus aureus, qui ne montre pas de tendance à disparaître.
Entre autres microbes aussi peu de colonies de staphylococcus pyogenes aureus.	A peu près exclusivement staphylocoque doré.		

*Expérience XII.* — *Cobaye 67.* Introduction du staphylococcus, 24 avril. Les phénomènes sont les mêmes que pour 59.

*Expérience XIII.* — *Cobaye 23,* auquel nous avons inoculé le 22 une culture de *prodigiosus*.

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT dans divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Leucocytose, peu de cellules épithéliales, très peu de microbes parmi lesquels un diplococcobacille qui se décolore par le Gram.	Même aspect qu'avant, en plus le B. prodigiosus. 52 heures après, cellules épithéliales. Forte leucocytose. Phagocytose. Microbes en quantité assez notable.	52 heures après.

*Expérience XIV.* — *Cobaye 97,* dont nous avons badigeonné la partie vaginale avec une culture prise de *B. prodigiosus*.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Cellules épithéliales. Leucocytes. Peu de phagocytose. Microbes assez nombreux, surtout bacilles. Peu de coccus.	1 heure après: B. prodigiosus très nombreux. Coccus, bacilles. 24 heures après. Prodigiosus peu nombreux. Présence d'autres microbes. Coccus, bacilles, chaînettes de streptococcus.	5 heures après.

*Expérience XV-XVI.* — Sur une jument en chasse nous faisons une prise de mucus vaginal à l'aide d'un spéculum en verre que nous introduisons assez profondément. Nous pouvons retirer un peu plus d'un centimètre cube d'un mucus légèrement trouble. Ce mucus est introduit dans un tube stérile et nous sert comme milieu de culture pour le bacillus prodigiosus, et

pour le bacillus pyocyaneus. La réaction est nettement alcaline.

A l'examen microscopique, nous trouvons :

Cellules épithéliales. Leucocytes assez nombreux. Quantité de cils provenant probablement des cellules utérines, microbes, surtout chaînettes assez longues, streptococciques, et un bacille quisedécoulorepour le Gram (Coli?). Petits amas staphylococciques.

Le mucus ensemencé avec les microbes susdits fut mis à l'étuve à 38°. Nous faisons de temps en temps une prise et nous l'ensemencions dans les milieux ordinaires. Les prises faites après 2, 4, 24, 48 et 72 heures ont bien poussé. La seule remarque que nous ayons faite, c'est que le *prodigiosus* des premières 24-heures est resté incolore. Toujours est-il que le mucus n'a tué ni le *prodigiosus*, ni le *pyocyaneus*, *in vitro*. Les autres microbes, et notamment le *staphylococcus albus* qui se trouvait dans le mucus, ont également poussé.

Dans le vagin d'une chienne nous avons trouvé de même :

1 (108). *Un diplococcus géant*, à très grands éléments, se colorant bien par les couleurs anilénées et le Gram, légèrement mobile, se développe vite à 20° sur gélose, en colonies opaques jaunâtres avec une légère teinte brunâtre : ne liquéfie pas la gélatine. Ensemencé en piqûre dans la gélatine, ne se développe qu'à la surface. Le bouillon reste clair. La culture injectée dans le péritoine d'une souris ne la tue pas.

Ce diplococcus nous a beaucoup intéressé parce que nous le trouvions constamment dans le mucus vaginal de cette chienne, mais ses cultures faites simultanément avec le *prodigiosus*, le *staphylococcus*, le *pyocyaneus*, ont poussé et n'ont empêché le développement de ces derniers dans aucun des milieux.

2 (107). *Streptococcus pyogenes*, qui apparaissait dans le mucus vaginal presque toujours sous forme de diplococcus.

3. *Staphylococcus pyogenes albus*, toujours et en grand nombre.

4. *Staphylococcus citreus* et *roseus*.

6. *Bacillus subtilis* en très grand nombre à l'entrée du vagin, peu nombreux à la profondeur, mais toujours présent.

7. *Bacillus coli communis*, presque toujours.

8. *Un diplococcobacille*, qui ne prend pas le Gram, ne liquéfie pas la gélatine, ne produit pas de gaz dans le milieu sucré, ne



donne pas la réaction de l'indol. Antagonismes comme 108.

9 à 12. *Sarcina orangea* deux fois. *Filaments d'un champignon*. *Aspergillus fumigatus* 1 fois. *Une levure*.

13. *Anaérobies* (1). Un bacille long, gros, mobile, liquéfiant la gélose sucrée et produisant une forte acidité dans ce milieu. Il se développe dans les premières 24 heures à 40°. Colonies petites, à peine visibles, entourées d'une petite bulle de gaz. Au fond du tube, ces colonies forment un voile qui nage sur le liquide fortement acide. Gram négatif. Tue la souris. Je ne l'ai trouvé qu'au commencement de mes recherches.

2. Petit *micrococcus* se développant dans les 48 heures, formant de toutes petites colonies blanches opaques, sans production de gaz. Gram négatif. Je l'ai trouvé plus souvent que le premier.

3. Un *streptococcus* à grands grains et longues chaînettes de 20-30 et plus encore. Gram ; non pathogène pour le lapin. Se développe très mal sur les milieux aérobies.

Nous n'avons pas trouvé le staphylocoque doré et il paraît que, dans le vagin des animaux, le St. blanc est de beaucoup plus fréquent. Mais après l'introduction expérimentale du staphylocoque doré, nous le trouvions régulièrement.

*Microbes trouvés chez le cobaye*. — 1. Bacille petit apparaissant surtout comme diplobacille. Gram ; se développe très bien dans le milieu de Veillon, en produisant des colonies blanches, opaques, lenticulaires. Aérobie facultatif. Non pathogène pour la souris.

2. *Bacillus subtilis*.

3. *Bacillus coli communis*, très fréquent.

4. Un coccobacille se colorant aux bouts et laissant le centre incolore. Gram indécis, plutôt négatif. Par ses autres qualités analogues au coli ; ne donne pas la réaction de l'indol. Est à peu près constant dans le vagin de la femelle du cobaye.

5. Un tout petit bacille très mobile, se décolorant par le Gram.

6. *Streptococcus pyogène*.

7. Un très petit coccus en amas analogue au *Staph. albus*.

Tous ces microbes ont étéensemencés dans divers milieux en même temps que les microbes introduits expérimentalement ; ils n'ont pas empêché le développement de ces derniers.

Comme on le voit, et je suis loin d'avoir épuisé la flore microbienne des animaux expérimentés, le vagin contient des microbes et des espèces microbiennes en assez grand nombre.

# SUR LES ÉPIDÉMIES DE PESTE BUBONIQUE

A l'Assomption (Paraguay) et au Rosario (République Argentine)<sup>1</sup>.

PAR LÉOPOLD URIARTE

Médecin de l'hôpital Rawson; attaché au Laboratoire des Grands Éleveurs,  
dirigé par M. J. Lignières, d'Alfort; membre de la Commission sanitaire  
argentine envoyée au Paraguay.

---

Dans les premiers jours du mois de septembre 1899, on apprenait à Buenos-Ayres que dans la ville de l'Assomption était apparue une maladie, à marche suraiguë, une fièvre maligne, disait-on. Elle avait pris un développement épidémique dans les casernes et les prisons de la ville.

Certains médecins soutenaient qu'on était en présence de la maladie connue sous le nom de *Buba*. J'ai eu plus tard l'occasion de m'assurer que cette « buba » doit être considérée comme une polyadénite d'origine syphilitique. L'immense majorité des médecins avouait ne pas connaître la nature exacte de cette nouvelle maladie, tout en reconnaissant des ressemblances cliniques assez grandes avec la peste bubonique.

Les autorités sanitaires de Buenos-Ayres, au courant de ces faits, soupçonnèrent aussitôt qu'il s'agissait de peste. Le docteur E. Wilde, président du Département national d'hygiène, pour lever tous les doutes, résolut d'envoyer au Paraguay deux médecins, MM. les D<sup>rs</sup> O. Voges et J. C. Delfino, qui, arrivés à l'Assomption le 14 septembre, annonçaient quelques jours après à Buenos-Ayres que, d'après leurs recherches bactériologiques, c'était bien la peste bubonique.

Le gouvernement argentin, avec l'assentiment des autorités du Paraguay, décida alors l'envoi sur les lieux infectés d'une

1. Dans l'intéressant mémoire qui nous a été envoyé sous ce titre par le D<sup>r</sup> Uriarte en juin 1904, nous choisissons, pour la publier, la partie qui est l'intérêt général : c'est l'histoire du transport de la peste au milieu d'un continent, sans étapes intermédiaires.

commission médicale, dans le but d'étudier et combattre l'épidémie.

Cette commission était formée par les D<sup>rs</sup> C. Malbran, S. Alvarez, J. C. Delfino, O. Voges, A. Medina et L. Uriarte.

*Marche et propagation du fléau à travers l'estuaire de la Plata et de ses affluents, le Parana et le Paraguay.*

Quelques notions très rapides sur la configuration de l'estuaire de la Plata et de ses affluents principaux sont indispensables pour bien suivre la marche de l'épidémie de peste bubonique dans cette partie du continent américain.

L'estuaire de la Plata a une étendue de 33,000 kilomètres carrés; à l'embouchure, sa largeur atteint 180 kilomètres.

Le Paraguay, au bord duquel est bâtie l'Assomption, se jette dans le Parana qui, à son tour, déverse ses eaux dans la Plata, où se trouvent Buenos-Ayres sur la rive droite et Montevideo sur la rive gauche.

Formosa, Corrientes et Rosario sont trois villes argentines, situées la première sur le fleuve Paraguay, les deux autres sur le Parana.

Un navire quittant le port de Montevideo pour pénétrer dans le fleuve fait escale à Buenos-Ayres (200 kilomètres), Rosario (290 kil.), Corrientes (720 kil.), Formosa (170 kil.), Assomption (160 kil.)

La distance qui sépare Montevideo de l'Assomption est donc de 1,540 kilomètres, qui sont franchis en bateau à vapeur en sept jours.

Fait curieux, qui sera expliqué dans la suite, ayant franchi d'un bond l'océan Atlantique et ce magnifique cours d'eau, long de 1,600 kilomètres, la peste fait sa première apparition en Amérique en plein pays méditerranéen, au Paraguay.

De l'Assomption du Paraguay, par un trajet rétrograde, en suivant toujours la route maritime des communications commerciales, elle envahit successivement Formosa, Corrientes, Rosario et Buenos-Ayres.

Entrons dans le détail de la marche de l'épidémie. Le 19 avril 1899, le paquebot *Centauro* quittait le port de Montevideo à destination de l'Assomption. A Montevideo il reçut un charge-



ment de marchandises diverses et *des sacs de riz* qui furent placés dans la cale inférieure. Ces sacs de riz provenaient d'un navire d'outre-mer, ancré alors en rade de Montevideo, et furent transbordés directement au *Centauro* sans passer par la douane de la ville.

D'après les renseignements pris par le docteur Medina, ce navire arrivait de Rotterdam et aurait eu pendant la traversée deux morts dans l'équipage; on avait constaté en outre une mortalité parmi les rats.

Le 26 avril, le *Centauro* arrivait à l'Assomption. Le déchargement terminé, les matelots trouvèrent au fond de la cale inférieure, où étaient placés les sacs de riz, une trentaine de rats morts qui furent jetés à l'eau. Cette mortalité ne laissa pas de les surprendre.

Le lendemain même de l'arrivée, deux matelots G. F... et A. I... tombaient gravement malades. On les débarqua pour mieux les soigner; ils succombèrent tous les deux le 28 et le 30 avril. Chez le premier la mort arriva en moins de 36 heures on constata les symptômes suivants : point de côté très douloureux à droite du thorax, dyspnée, vomissements abondants, diarrhée, fièvre intense et un bubon dans l'aîne.

Le 29 avril, deux autres matelots du *Centauro* étaient atteints subitement; le premier guérit en conservant pendant quelque temps une hypertrophie des ganglions inguinaux qui n'arrivèrent jamais à la suppuration; l'autre mourut le 3 mai. Voici le résultat de l'autopsie : foyers d'hépatisation pulmonaire; adhérences et congestion des deux plèvres; épanchements séro-fibrineux dans les deux cavités pleurales; congestions et ecchymoses méningitiques; congestions et ecchymoses sous-muqueuses de l'estomac et de l'intestin; augmentation de volume du foie et des reins; rate hypertrophiée, congestionnée et ramollie. On remarqua l'existence d'un bubon sans attribuer à cette constatation une grande importance.

Les marchandises apportées par le *Centauro* furent débarquées en douane. Douze à quinze jours après l'arrivée du navire, les employés de la douane remarquèrent déjà un grand nombre de rats morts; cette mortalité ne tarda pas à se propager aux rongeurs du voisinage.

En juin et juillet on signale des cas parmi les charretiers et

les portefaix du port, et les marchands ambulants qui fréquentaient ces parages.

La situation méditerranéenne du Paraguay, séparé de tout foyer pesteux par d'immenses territoires indemnes, par l'Océan lui-même, sans communication directe avec l'Europe, était considérée comme une garantie plus que suffisante contre l'importation du bacille de Yersin, et faisait écarter le diagnostic de peste bubonique que certains médecins osaient prononcer avec timidité.

L'émoi causé par cette maladie à marche suraiguë, dont furent atteints les 4 matelots, se dissipa bien vite. Pendant 3 mois la tranquillité fut complète; les cas de juin et juillet passèrent inaperçus, et c'est seulement l'enquête minutieuse faite par nous qui a permis de les relier entre eux et de les rattacher à leur véritable cause.

Au mois d'août, on s'émeut de nouveau. A ce moment il existe déjà un foyer important épidémique au quartier désigné sous le nom de *Rancheria de la Encarnacion*, situé tout près du port, formé de huttes où logent des femmes de soldats, et bien connu par son insalubrité.

A quelques mètres de ce quartier se trouvent les casernes de la ville, de vieux bâtiments d'aspect misérable. L'épidémie trouve là un terrain propice pour son développement. 37 soldats tombent malades; les autorités font disparaître par le feu les huttes de la Rancheria de la Encarnacion et décident l'évacuation d'une des casernes.

Les habitants de la Rancheria émigrent à la Chacarita et à la Loma Clavel, où se formèrent deux nouveaux foyers.

L'idée de l'existence d'une épidémie de peste bubonique prend corps tous les jours; mais, sans l'appui de la bactériologie, et peut-être aussi de propos délibéré, le diagnostic resta encore en suspens. On perdit un temps précieux en discussions inutiles, qui empêchèrent l'adoption de mesures énergiques capables d'arrêter la propagation du fléau.

Pendant le mois d'août, on constata 39 cas éparpillés dans toute la ville, dont plusieurs à la caserne, présentant tous les mêmes symptômes, aussi violents que ceux observés au mois d'avril.

D'après le diagnostic des médecins du pays, c'étaient des

cas de fièvre infectieuse typhoïde, purulente, gastrique, ou de méningite, pleuro-pneumonie, etc.

Au mois de septembre, après l'arrivée de la Commission argentine, le diagnostic de peste bubonique est officiellement accepté.

Au mois de septembre on déclare.....	53 cas
— octobre.....	67 —
— novembre.....	31 —
— décembre.....	48 —

Les environs de la ville et les localités situées sur l'unique ligne de chemin de fer de Paraguay furent aussi contaminés; on y signala plusieurs cas éparpillés, mais jamais de véritables foyers épidémiques.

La Commission argentine quitta l'Assomption le 28 janvier. Le gouvernement du Paraguay déclara l'épidémie éteinte au mois de février; cependant des cas continuaient à se produire et devinrent si nombreux qu'en juillet les autorités déclarèrent de nouveau l'existence de la peste dans la capitale de la république. Au mois d'août, on annonce officiellement la disparition du fléau, pour revenir encore une fois le 31 octobre à la déclaration de son existence. En somme la ville de l'Assomption et plusieurs localités des environs doivent être considérées comme des foyers probablement permanents de peste.

Dans ces derniers jours, la maladie vient reparaitre à Ville-Conception, située à 400 kilomètres de l'Assomption, sur la rive droite du Paraguay.

La république Argentine est envahie à son tour au mois de septembre. A cette époque, au Rosario, ville de 105,000 habitants, située sur le fleuve Parana, trois portefaix des grands entrepôts du port tombent subitement malades : deux guérissent, le troisième meurt le 10 octobre.

Une autre personne, qui habitait la maison où logeaient ces portefaix, présente le 3 octobre les symptômes suivants : rachialgie, céphalalgie, fièvre élevée, dyspnée, râles sous-crépitaux aux deux bases, albuminurie, larges ecchymoses dans les régions lombaires, et hypertrophie des ganglions inguinaux. Elle mourut le 21 octobre; autopsie : œdème des méninges; pneumonie du lobe inférieur du poumon droit; myocardite aiguë; congestion et hypertrophie du foie; conges-



tion, hypertrophie et ramollissement de la rate; néphrite aiguë; hémorragies sous-muqueuses de l'estomac et de l'intestin; hypertrophie et congestion des ganglions inguinaux avec infiltration périganglionnaire; ecchymoses sous-cutanées au niveau du thorax et suffusions sanguines intra-musculaires des lombes.

Presque en même temps, dans une maison voisine, une femme tomba malade. Le médecin qui la soigna nous fournit les renseignements suivants sur la marche de la maladie. Cette femme était enceinte presque à terme; elle présentait tous les signes classiques d'une pneumonie, avec angoisse prononcée. On observait quelques pétéchies sur la paroi abdominale des ganglions inguinaux et axillaires. Elle accoucha d'un enfant mort, sans présenter dans la suite des complications puerpérales. Elle succomba le 22 octobre. Autopsie : piqueté hémorragique des deux plèvres; congestion et œdème pulmonaire; foyers de pneumonie; myocardite; foie congestionné et hypertrophié; néphrite parenchymateuse; piqueté hémorragique sous-muqueux dans l'estomac et sous-péritonéal dans l'intestin; ganglions inguinaux de la grosseur d'une noix avec infiltration du tissu cellulaire périganglionnaire.

En novembre on constatait dans les entrepôts du port une mortalité extraordinaire de rats. Les cadavres des rongeurs se trouvaient par centaines échelonnés le long des chemins qui conduisent aux dépôts de grains des compagnies des chemins de fer, à la Raffinerie argentine, et à La Germania, grand entrepôt de céréales et autres produits du pays destinés à l'exportation. Cette épidémie de rongeurs ne tarda pas à se montrer sur plusieurs points de la ville, principalement dans les entrepôts de bois provenant du Paraguay et dans les écuries.

Sur plusieurs rats morts qui étaient porteurs de vrais bubons, on trouva le microbe de Yersin.

« La Germania », la « Raffinerie argentine » et les entrepôts de grains constituent les premiers en date et les principaux foyers d'infection. Les ouvriers de ces établissements payèrent un lourd tribut à l'épidémie.

Jusqu'au commencement de janvier, le diagnostic de presque tous ces cas fut erroné. A ce moment le nombre des malades devint si considérable que les autorités sanitaires fédérales

s'alarmèrent, et décidèrent d'envoyer le Dr Delfino pour en faire l'étude clinique et bactériologique.

Tous les malades présentaient les symptômes observés à l'Assomption. Cliniquement il n'y avait pas de doute, on était en présence d'une épidémie de peste bubonique; l'examen bactériologique révéla l'existence chez tous les malades du bacille de Yersin.

Vers la fin de janvier 1900, presque toute la ville était atteinte par l'épidémie. Les statistiques du lazaret signalent dans toute la ville :

Au mois de janvier.....	29 cas.
— février.....	29 —
— mars.....	36 —

Il nous a été impossible d'avoir le chiffre exact en avril et mai.

Le 11 mai, le gouvernement déclara officiellement que l'épidémie était éteinte.

Quelle est l'origine de cette épidémie de Rosario? L'enquête que nous avons faite ne nous permet pas de répondre catégoriquement à cette question. Tout porte à penser cependant que le point de départ des épidémies de peste observées dans la république Argentine se trouve à l'Assomption.

Le *Centauro*, qui a fait escale au Rosario le 22 avril, en route pour l'Assomption, n'a pas pu contaminer la ville, car c'est seulement à l'Assomption qu'on ouvrit la cale inférieure du navire où l'on trouva des rats morts. Si l'on tient compte d'autre part du nombre considérable de marchandises qui, du Paraguay, sont exportées au Rosario, les bois surtout qui logeaient très sûrement des nids de rats; si l'on considère que les premiers foyers ont été observés dans les entrepôts de bois du Paraguay, on est autorisé à croire que le bacille de Yersin a été importé de l'Assomption au Rosario.

A Formosa, ville de 1,597 âmes, située sur le Paraguay, on signale le 6 novembre un premier cas. C'était un enfant, âgé de six ans, qui présenta tous les symptômes typiques de la peste avec bubon inguinal du côté gauche. On observa encore un autre cas, qui évolua en trois jours sous la forme d'une méningite pesteuse avec bubons. Les deux malades succombèrent;



l'examen bactériologique des bubons révéla la présence du bacille de Yersin.

Il a été impossible d'établir l'origine de la contagion dans ces deux cas. On remarqua aussi une mortalité parmi les rats.

Des mesures énergiques prises à temps arrêterent le développement de l'épidémie.

A Corrientes, ville de 20,000 habitants, située sur le Parana, on signale un cas suspect le 23 octobre. Il s'agissait d'une femme présentant des symptômes d'une infection suraiguë avec bubons, et qui mourut en 50 heures.

A l'autopsie on trouva des ecchymoses sous-cutanées au niveau du thorax ; congestion et œdème pulmonaire ; épanchement séro-sanguinolent des deux cavités pleurales, avec piqueté hémorragique de la séreuse ; ecchymoses péricardiques ; ecchymoses sous-péritonéales et congestion de l'intestin ; ecchymoses sous-muqueuses et sous-séreuses de l'estomac ; ecchymoses sous-capsulaires du rein et périrénales, qui s'étendaient à travers le tissu cellulaire sous-péritonéal jusqu'au petit bassin, et formaient dès hématomes péri-ovariques. Engorgement inguinal et pelvien.

Il ne fut pas pratiqué d'examen bactériologique. Les autorités sanitaires de Corrientes considérèrent le cas comme suspect, et prirent des mesures en conséquence. On ne signala pas de nouveaux cas.

Le 26 janvier, on signale les deux premiers cas de peste à Buenos-Ayres, après examen bactériologique, parmi les employés du « Moulin de l'Ouest », où l'on constata aussi une mortalité extraordinaire de rats. Cette épidémie dura jusqu'au mois de mai : les cas observés, d'après les statistiques officielles, furent au nombre de 118. Je n'insiste pas davantage sur cette épidémie qui ne rentre pas dans le cadre de cette étude.